

# 采用 Reeko Fotector 06 全自动固相萃取仪分析饲料中黄曲霉素

**摘要:** 依据 GB/T18979-2003 食品中黄曲霉毒素的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法, 试样经过甲醇-水提取, 提取液经过滤, 稀释后, 滤液经过含有黄曲霉素特异抗体的免疫亲和层析净化, 此抗体对黄曲霉素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 具有专一性, 黄曲霉素交联在层析介质中的抗体上。用水或者吐温-20/PBS 将免疫亲和柱上的杂质除去, 以甲醇通过免疫亲和层析柱洗脱, 洗脱液通过带有荧光检测器的高效液相色谱仪后碘溶液衍生测定黄曲霉素的含量。

**关键词:** 黄曲霉素 Reeko Fotector 全自动固相萃取仪 免疫亲和柱 HPLC

## 1. 试剂、仪器及其器材

### 1.1. 试剂

- 1.1.1 甲醇 (色谱纯);
- 1.1.2 甲醇-水 (7+3): 取 70mL 甲醇加 30mL 水;
- 1.1.3 甲醇-水 (45+55): 取 45mL 甲醇加 55mL 水;
- 1.1.4 苯 (色谱纯);
- 1.1.5 乙腈 (色谱纯);
- 1.1.6 苯-乙腈 (98+2): 取 2mL 乙腈加 98mL 苯;
- 1.1.7 氯化钠;
- 1.1.8 黄曲霉素标准品 (黄曲霉素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>): 纯度 ≥99%;
- 1.1.9 黄曲霉素混合标准品工作液: 准确量取适量的黄曲霉素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准储备液, 用苯-乙腈 (98+2) 溶液稀释成混合工作液
- 1.1.10 柱后衍生溶液 (0.05% 碘溶液): 称取 0.1g 碘, 溶解于 20mL 甲醇后用水定容至 200mL, 以 0.45μ m 的尼龙滤膜过滤, 4℃ 保存。

### 1.2. 仪器和设备

- 1.2.1 Reeko Fotector 全自动固相萃取仪;
- 1.2.2 免疫亲和柱;
- 1.2.3 恒温摇床;
- 1.2.4 黄曲霉毒素免疫亲和柱;
- 1.2.5 玻璃纤维滤纸: 直径 11 cm, 孔径 1.5 μ m;
- 1.2.6 玻璃试管: 直径 12 mm, 长 75 mm, 无荧光特性;
- 1.2.7 高效液相色谱仪: 具有 360 nm 激发波长和大于 420 nm 发射波长的荧光检测器;
- 1.2.8 色谱柱: C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm × 5 μ m)。

## 2. 实验方法

- 2.1. 提取: 准确称取经过磨细 (粒度小于 2 mm) 的试样 25.0 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入 5.0 g 氯化钠及甲醇-水 (7+3) 定容至 100 mL (V<sub>1</sub>), 用恒温摇床震荡 4h。用定量滤纸过滤, 准确移取 2mL (V<sub>2</sub>) 滤液到 Fotector 上样瓶中并加入 8mL (V<sub>3</sub>) 水稀释, 备用
- 2.2. 净化: 将免疫亲和柱中的上下保护套去掉, 让缓冲液缓缓流过柱体, 然后将柱子安装到 Reeko Fotector 上, 以 3mL /min 的速度上样, 用 5mL 水清洗样品瓶后用 3mL 水以 3mL /min 的速度淋洗免疫亲和柱, 用气推将柱中的水挤干, 最后以 1mL 的甲醇和 1mL 水以 1mL /min 的速度洗脱样品。收集洗脱液直接 HPLC 检测。

表 2.1 Fotector 系统程序

编号	操作命令	溶剂	流速 (ml/min)	体积 (ml)	时间 (min)	排出
1	上样		3.0	10	4.3	废液1
2	清洗样品瓶	水	90.0	2.5	1.4	废液1
3	淋洗	水	2.0	4	2.4	废液1
4	气推		20.0	10	1.0	废液1
5	气推		20.0	10	1.0	废液1
6	清洗注射泵	甲醇	10.0	2	0.4	
7	洗脱	甲醇	1.0	1	1.1	收集
8	气推		1.0	2	1.0	收集
9	洗脱	水	1.0	1	1.1	收集
10	气推		1.0	2	1.0	收集
11	气推		20.0	20	1.0	收集
12	结束				15.7	

#### 2.4. 仪器条件

流动相：甲醇-水(45+55)；流速：0.8 mL/min

柱后衍生化系统

衍生溶液:0.05%碘溶液；衍生溶液流速:0.2 mL/min；反应管温度:70℃；反应时间:1min。

### 3 讨论

#### 3.1 实验结果

利用外标法得到了以下的回收率结果。

表 1 进样浓度

名称	保留时间	测定浓度 (ng/mL)	加标量(ng)	回收率%
黄曲霉毒素 G1	8.055	0.345277	52.7	65.5%
黄曲霉毒素 B1	12.852	0.340962	51.3	66.4%

测定浓度×2（样品定容体积）×50（稀释倍数）

$$\text{回收率} = \frac{\text{测定浓度} \times 2 \times 50}{\text{加标量}} \times 100$$

#### 3.2 加标回收的讨论

由于国标没有给出具体的回收率要求，根据手动 SPE 分析饲料中的黄曲霉素的回收率经验值为 60%–90%，本实验利用 Reeko Fotector06 全自动固相萃取仪所获得的加标回收率在 65%–67%之间，结果能够满足分析要求。

### 4. 结论

采用 Reeko Fotector06 全自动固相萃取仪能够很好的重现《GB/T18979-2003 食品中黄曲霉毒素的测定》，加标回收率在 65%~67%之间，能够满足饲料中黄曲霉素的检测需求。